

University of Groningen

**Studies over de synthese van alfa, beta en gammaketens in reticulocytenrijk bloed met  
 behulp van gemerkte aminozuren**

Pik, Cornelis

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

1965

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Pik, C. (1965). *Studies over de synthese van alfa, beta en gammaketens in reticulocytenrijk bloed met behulp van gemerkte aminozuren*. s.n.

**Copyright**

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

**Take-down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

*Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.*

## INLEIDING

Geen van de bij de mens voorkomende eiwitten is beter onderzocht dan het haemoglobine. Niet alleen zijn de aminozuurvolgorde in de polypeptideketens en de ruimtelijke structuur bekend, doch ook over de functie van de rode bloedkleurstof zijn we bijzonder nauwkeurig ingelicht.

Het is gebleken dat bij de mens tenminste drie varianten isoproteïne, de haemoglobines A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub> en F voorkomen. De haemoglobine-moleculen zijn opgebouwd uit vier ketens, die twee aan twee gelijk zijn. Bovengenoemde haemoglobines bleken allen slechts in de aminozuurvolgorde in één der ketensoorten van elkaar af te wijken. De voor alle drie soorten gelijke keten wordt  $\alpha$  keten genoemd, terwijl de andere ketens voor Hb A<sub>1</sub>, Hb A<sub>2</sub> en Hb F respectievelijk met  $\beta$ ,  $\delta$  en  $\gamma$  worden aangeduid. De synthese van elk van deze ketens wordt door een aparte combinatie van een regulator gen en een structuur bepalend gen geregeld. Merkwaardig genoeg wisselt de verhouding waarin deze varianten worden gesynthetiseerd met de leeftijd. Bij een aantal erfelijke aandoeningen is de kwantitatieve verhouding waarin deze haemoglobinevormen in de rode bloedcel voorkomen gewijzigd.

Naast de drie genoemde vormen van het haemoglobine, die bij ieder individu voorkomen, kennen we een groot aantal (ongeveer zestig) erfelijke varianten, waarvan het voorkomen in de meeste gevallen tot een gering aantal families is beperkt en waarbij telkens in één der polypeptide ketens één aminozuur door een ander is vervangen. In enkele gevallen geven deze abnormale haemoglobines aanleiding tot een functiestoornis. Soms is de synthese snelheid van de abnormale varianten verlaagd, terwijl in een aantal gevallen de erfelijke variatie volkomen goedaardig is, en noch de functie, noch de synthesesnelheid van die van het normale haemoglobine afwijkt.

Het is begrijpelijk, dat nu de voornaamste problemen betreffende

de structuur van de normale en abnormale haemoglobines zijn opgelost, de belangstelling in stijgende mate uitgaat naar de synthese van de rode bloedkleurstof.

In vergelijking met de synthese van de meeste eiwitten laat zich de haemoglobinesynthese eenvoudig bestuderen. Deze gaat namelijk nog door, nadat de erythrocyt haar celkern reeds heeft verloren, bij welk proces het DNA, dat de primaire genetische informatie voor de synthese van eiwitten bevat, verloren is gegaan. Het in het protoplasma aanwezige aan de ribosomen gebonden „messenger” RNA is in staat nog enige tijd met de haemoglobinesynthese door te gaan. Niet in alle erythrocyten is de haemoglobinesynthese nog mogelijk. Deze is beperkt tot de jongste vorm der kernloze erythrocyt, de zogenaamde reticulocyt. Wil men bij de mens dus een onderzoek naar de synthese van haemoglobine in de kernloze rode cel doen, dan dient men van reticulocytenrijk bloed uit te gaan. Daar het Hb A<sub>1</sub> uit twee  $\alpha$  en twee  $\beta$  ketens bestaat, het Hb F uit twee  $\alpha$  en twee  $\gamma$  ketens en het Hb A<sub>2</sub> uit twee  $\alpha$  en twee  $\delta$  ketens, zal de hoeveelheid gesynthetiseerde  $\alpha$  keten steeds even groot moeten zijn als de som van de synthese van de  $\beta$ ,  $\gamma$  en  $\delta$  ketens, indien er althans geen overschot van een der ketensoorten wordt gevormd.

Door zeer kort te incuberen met gemerkte aminozuren en verlagen der temperatuur zal men in analogie met het door Dintzis bij konijnen verrichte onderzoek (Dintzis 1961) kunnen trachten bij de mens een indruk te verkrijgen over het feit of de syntheseactiviteit voor  $\alpha$ ,  $\beta$  en  $\gamma$  ketens bij benadering gelijk is. Men kan dan door vergelijking met uitkomsten verkregen bij een langere incubatietijd zien of verschuivingen in deze syntheseactiviteit optreden. Men kan verwachten dat dit probleem zich bij de mens moeilijk laat bestuderen. De hoeveelheden in de ketens geïncorporeerde gemerkte aminozuren zijn, daar de hoeveelheid reticulocyten bij de mens zelden zo hoog is als bij het dierexperiment en bovendien de reticulocyten vaak tot de niet syntheseactieve groep behoren (London e.a. 1948, Borsook e.a. 1962), in een kort tijdbestek gering, en laten zich dus moeilijk meten.

Een andere vraag die zich voordoet is of in vitro bij langer durende synthese de hoeveelheid gevormde  $\alpha$  en  $\beta$ , of  $\alpha$  en  $\gamma$  keten aan elkaar gelijk is. Er bestaat namelijk de mogelijkheid, dat van één der ketens in de cel een kleine voorraad bestaat en niet van de an-

dere keten. Deze voorraad kan tijdens de synthese in vitro worden opgebruikt. Ook kan deze blijven bestaan, waarbij dan pas gevormde ketens worden toegevoegd aan de voorraad, terwijl ketens uit de voorraad worden gebruikt voor haemoglobinesynthese. Verder kan men zich voorstellen, dat tijdens het incubatieproces de synthese van één der ketens eerder neigt te verminderen dan die van de andere keten. Hierdoor kan een surplus van die andere ketens ontstaan, die zich tot  $\alpha_4$ ,  $\beta_4$  of  $\gamma_4$  complexen zullen kunnen verenigen. Ook kan, wanneer de synthese van bijvoorbeeld de  $\beta$  keten afneemt, de  $\gamma$  keten synthese toenemen waardoor bij combinatie tot haemoglobine geen overschot  $\alpha$  ketens ontstaat. Het gevolg van dit alles zal zijn, dat in het nieuw gesynthetiseerde haemoglobine de hoeveelheid gemerkt aminozuur in de ene keten geringer zal zijn dan in de andere.

Tenslotte doet zich nog de vraag voor of, indien het bloed twee haemoglobinevormen naast elkaar bevat, bijvoorbeeld de haemoglobines A en F of S en F, de hoeveelheid waarin deze soorten tijdens het incubatie experiment worden gevormd gelijk is aan de verhouding waarin ze in de cel voorkomen. Met andere woorden, of tijdens de voor een cel enige dagen durende haemoglobinesynthese de twee haemoglobine vormen steeds in dezelfde verhouding worden aangemaakt. Hierbij wordt aangenomen dat de levensduur van deze eiwitten in de cel gelijk is.

Alvorens nader op deze vragen in te gaan zal in het volgende hoofdstuk een literatuuroverzicht worden gegeven.

## SUMMARY

The aim of this thesis is to get information about the in vitro synthesis of the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  chains, the protein components of the human haemoglobin A and F. This synthesis was studied with the aid of the incorporation of radioactive aminoacids in the haemoglobin by in vitro incubations.

After the introduction in which the questionable points are outlined briefly, there follows in Chapter I a review of the literature.

In Chapter II a description is given of the used incubation methods, the separations of haemoglobins, the splitting of the haemoglobins into chains and peptides, and the measuring of the radioactivity.

Chapter III is an introduction to the experimental work in which the problems, occurring with the use of radioactive aminoacids, will be described and in which the possibilities for the synthesis will be discussed more accurately.

After this introduction the experimental data related to the difficulties mentioned above are given, followed by a description of the experiments dealing with the questionable points. The incorporation of labelled aminoacids in the in vitro synthesis of haemoglobin with blood of infants with a severe erythroblastosis foetalis was found to be high.

The differences in the synthesis activity of the  $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$  chains were determined by means of the short and long incubations. Differences were found between the synthesized amounts of Hb A and Hb F by the short and long incubations, and the same differences also exist between  $\beta$  and  $\gamma$  chain synthesis. At the same time a difference was found between the  $\alpha$  and  $\beta$  and  $\alpha$  and  $\gamma$  chains of Hb A and Hb F respectively. An explanation for the difference in the synthesis of Hb A and Hb F was proposed in an relatively increasing synthesis of Hb F during the incubating experiments. The difference

between the radioactivity of the  $\alpha$  and  $\beta$  and  $\alpha$  and  $\gamma$  chains was explained by postulating a small surplus of chains present at the start of the experiment, for instance  $\beta_4$ , which results in a lower average radioactivity of that chain.

In the last paragraph the results of the incubation experiments are discussed in which blood of patients with elevated number of reticulocytes caused by haemolytic anaemias, enzyme deficiency, or haemoglobinopathies, was used. Only with the blood of patients with sicklecell anaemia the incorporation of radioactive aminoacids was found to be comparable with that with the blood of erythroblastosis foetalis patients. The rate of synthesis by all other patients was very low. The results of the experiments in the case of sicklecell anaemia confirm those from the previous paragraph.

The possibility of in vitro incubation studies with labelled aminoacids, to get more information about the haemoglobin synthesis in patients with different forms of anaemia, is discussed.